

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 avril 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/31523 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01R 33/465, C12Q 1/02,
G01N 1/42, G01R 33/30, G01N 33/483

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03167

(22) Date de dépôt international :
12 octobre 2001 (12.10.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/13183 13 octobre 2000 (13.10.2000) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
METABOLIC EXPLORER [FR/FR]; Biopole Clermont-Limagne, F-63360 Beauzire (FR). **BRUKER SA** [FR/FR]; 34, rue de l'Industrie, F-67160 Wissembourg (FR).

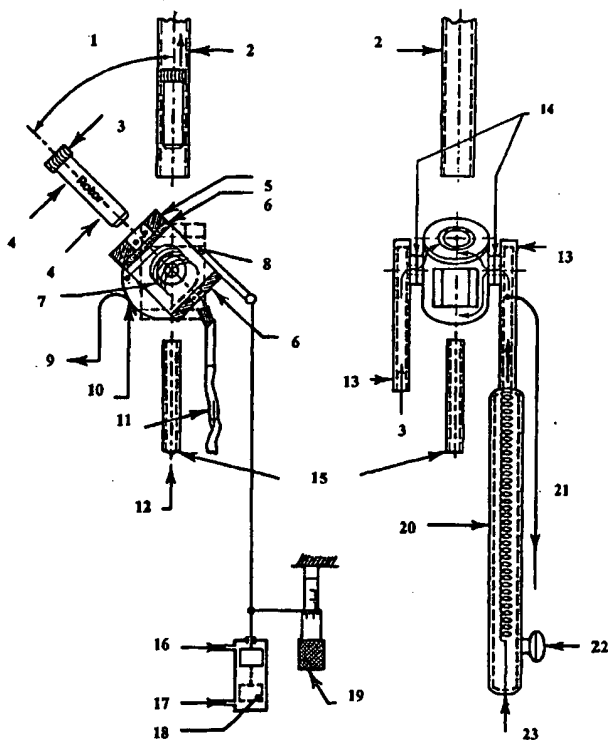
(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **GONZALEZ, Benjamin** [FR/FR]; 4, rue Sidoine Apollinaire, F-63000 Clermont-Ferrand (FR). **PIOTTO, Martial** [FR/FR]; 14, rue des colombes, F-67540 Oswald (FR). **HUBER, Gaspard** [FR/FR]; 6, rue Romain Rolland, F-19100 Brive La Gaillarde (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR ANALYSING THE INTRACELLULAR CHEMICAL STATE OF LIVING CELLS BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

(54) Titre : PROCÉDE ET DISPOSITIF D'ANALYSE DE L'ÉTAT CHIMIQUE INTRACELLULAIRE DE CELLULES VIVANTES PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLEAIRE



(57) Abstract: The invention concerns a method for analysing the intracellular chemical state of living cells by nuclear magnetic resonance (NMR). Said method comprises a step which consists in preparing the cell sample and a step which consists in an NMR analysis of the sample, both steps being carried out at very low temperature so as to freeze the biochemical state of the living cells to obtain specific and accurate reproducible measurements of the cellular functioning in given conditions. The invention also concerns the device coupled to the NMR spectrometer for implementing the method of analysis.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'analyse de l'état chimique intracellulaire de cellules vivantes par résonance magnétique nucléaire (RMN). Ce procédé comprend une étape de préparation de l'échantillon de cellules et une étape d'analyse de l'échantillon par RMN réalisées à très basse température afin de figer l'état biochimique des cellules vivantes de façon à avoir des mesures reproductibles spécifiques et justes du fonctionnement cellulaire dans des conditions données. L'invention concerne également le dispositif couplé au spectromètre RMN pour mettre en oeuvre le procédé d'analyse.

WO 02/31523 A1



09/553424



(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

« PROCÉDE ET DISPOSITIF D'ANALYSE DE L'ÉTAT CHIMIQUE
INTRACELLULAIRE DE CELLULES VIVANTES PAR RESONANCE
MAGNETIQUE NUCLEAIRE ».

La présente invention concerne un procédé non invasif
5 d'analyse *in vivo* du métabolisme intracellulaire. Le procédé utilise
la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour mesurer l'état
chimique intracellulaire des cellules animales, végétales ou de
micro-organismes cultivés dans des conditions définies et
contrôlées.

10 L'invention concerne en particulier un procédé d'analyse de
l'état chimique intracellulaire de cellules vivantes par RMN qui
comprend une étape de préparation de l'échantillon de cellules et
une étape d'analyse de l'échantillon par RMN réalisées à très basse
température afin de figer l'état biochimique des cellules vivantes de
15 façon à avoir des mesures reproductibles, spécifiques et justes du
fonctionnement cellulaire dans des conditions données. L'invention
concerne également le dispositif couplé au spectromètre RMN pour
mettre en œuvre le procédé d'analyse.

Les concentrations intracellulaires sont des paramètres
20 fondamentaux pour caractériser et corréler l'influence des
modifications génétiques et environnementales sur le
fonctionnement de la cellule (Weuster-Botz *et al.*, 1996 ; Teusink *et
al.*, 1998). Par la mesure des concentrations intracellulaires, il est
possible de déterminer un profil métabolique spécifique de
25 l'organisme vivant cultivé dans des conditions standards et de
comparer ce profil à ceux obtenus après modifications génétiques
ou après diverses conditions de culture.

Les techniques dédiées à la détermination *in vivo* des paramètres intracellulaires se divisent en 2 groupes : les méthodes invasives et les méthodes non invasives.

Les méthodes invasives nécessitent une destruction des
5 cellules et une extraction des composés chimiques intracellulaires. Ces deux étapes se déroulent dans des conditions physico-chimiques extrêmes. En conséquence, il est fréquent de trouver dans la littérature des données contradictoires pour les concentrations intracellulaires d'un même organisme cultivé dans
10 les mêmes conditions (Gancedo *et al.*, 1973; Weuster-Botz *et al.*, 1996 ; Gonzalez *et al.*, 1997).

Les méthodes non invasives comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) présentent l'avantage de caractériser l'état chimique intracellulaire de cellules vivantes sans perturbation du
15 métabolisme cellulaire (Gadian *et al.*, 1983). De nombreuses revues scientifiques montrent que cette technique est l'outil analytique le mieux adapté pour l'analyse *in vivo* du métabolisme intracellulaire (Jeffrey *et al.*, 1991 ; Cameron *et al.*, 1997).

Dans ce contexte, il a déjà été proposé de réaliser la détection
20 de l'état chimique de systèmes vivants par RMN. On peut citer, à cet égard la demande internationale de brevet WO 92/01946, qui vise un procédé de mesure par résonance magnétique nucléaire de l'état chimique de systèmes vivants animaux ou humains.

Si avec ce dispositif il est possible de détecter des
25 dysfonctionnements cellulaires sur des tissus par rapport à une référence définie sur des tissus sains, il est beaucoup plus difficile de l'appliquer pour corrélérer et caractériser spécifiquement une fonction cellulaire de micro-organismes, de cellules animales et de cellules végétales par la mesure RMN de l'état chimique

intracellulaire. En effet, la sensibilité des systèmes vivants aux conditions environnementales rend difficile l'application de ce dispositif pour mesurer l'état chimique intracellulaire des cellules et surtout pour corrélér spécifiquement cet état aux conditions
5 expérimentales. Ceci a été confirmé par Middleton *et al.* (1998) qui ont montré l'influence des conditions de préparation de tissus biologiques malades sur les profils métaboliques obtenus par RMN haute résolution à l'angle magique (plus connu sous l'acronyme RMN HR MAS signifiant High Resolution Magic Angle Spinning en
10 anglais). Par ces expériences, ils ont souligné la difficulté de corrélér les facteurs pathologiques expérimentés et les profils métaboliques mesurés avec le dispositif mentionné plus haut.

L'origine des difficultés pour associer spécifiquement un profil intracellulaire mesuré par les dispositifs RMN aux conditions
15 expérimentales réside dans la méthode et le temps écoulé pour la préparation et la mesure des échantillons. Il est important de souligner que les vitesses des réactions métaboliques et particulièrement de celles impliquées dans le métabolisme énergétique sont élevées ; par exemple la vitesse de conversion du
20 glucose intracellulaire est de $1 \text{ mmol.l}^{-1}\text{s}^{-1}$ et celle de l'ATP (Adénosine-Tri-Phosphate) est de $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}\text{s}^{-1}$ (De Koning et van Dam, 1992 ; Theobald *et al.*, 1993). Les teneurs intracellulaires reportées dans la littérature pour ces deux composés sont inférieures à 4 mmol.l^{-1} (Ryll *et al.*, 1991 ; Seiler *et al.*, 1994). Ces
25 données montrent qu'un temps de prélèvement et/ou un temps de mesure supérieur à 6 secondes a pour conséquence des variations importantes des concentrations intracellulaires.

Il est donc indispensable pour obtenir des mesures par RMN reproductibles et spécifiques du fonctionnement cellulaire pour une

condition donnée de maintenir les cellules dans un état stable non seulement entre le temps t_0 , de prélèvement des cellules depuis le procédé de culture des cellules et le temps t_1 de mesure de l'état chimique par résonance magnétique nucléaire, mais aussi pendant
5 la la mesure RMN.

La présente invention se propose donc de résoudre ces problèmes en fournissant un procédé permettant de figer l'état chimique des cellules mesuré par RMN afin de dresser avec précision le profil (code barre, signature) des métabolites
10 intracellulaires spécifiques du type cellulaire et des conditions expérimentales.

La présente invention concerne un procédé d'analyse de l'état chimique de cellules vivantes en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) par comparaison d'au moins un spectre de RMN
15 et/ou d'au moins une valeur de mesure de RMN obtenue sur un échantillon desdites cellules vivantes avec au moins un spectre de RMN et/ou d'au moins une valeur de mesure de RMN de référence obtenue sur au moins un échantillon de cellules vivantes de référence, de façon à identifier au moins un pic dudit spectre de
20 RMN et/ou au moins une valeur de mesure de RMN constituant un marqueur spécifique de l'état métabolique desdites cellules vivantes caractérisé en ce qu'il comprend une étape de préparation dudit échantillon dans des conditions permettant de figer l'état chimique desdites cellules vivantes.

25 C'est aussi un but de l'invention de fournir un procédé de préparation de l'échantillon qui assure la stabilité de l'état chimique intracellulaire depuis le prélèvement jusqu'à la mesure par RMN. Ainsi, le procédé selon l'invention se caractérise en ce que pour préparer ledit échantillon on le soumet à une très basse

température pendant un temps suffisant pour arrêter les réactions intracellulaires entre le moment du prélèvement dudit échantillon et le moment de mesure de l'état chimique des cellules, et éventuellement également pendant toute la durée de l'analyse.

5 L'invention concerne également un procédé caractérisé en ce que la préparation dudit échantillon comprend les étapes suivantes :

- a) l'immersion directe et immédiate dudit échantillon dans l'azote liquide;
- 10 b) la lyophilisation dudit échantillon ;
- c) éventuellement le stockage dudit échantillon à très basse température ;
- d) au moment souhaité pour l'analyse, le mélange et la remise en solution à très basse température dudit
- 15 échantillon lyophilisé avec un solvant ayant un point de fusion très bas.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que à la place de l'azote liquide, on utilise un mélange eau/méthanol tamponné à

20 très basse température. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le mélange eau/méthanol est tamponné à pH 7,5 et contient 50% de méthanol. Il est également dans l'étendue de l'invention d'utiliser d'autres composés organiques en mélange avec l'eau qui varient de par la nature du composé organique employé,

25 de par la proportion du composé organique dans le mélange, de par le pH du mélange. La présente invention concerne tous les mélanges composés organiques/eau et plus particulièrement alcool/eau pour lesquels le point de fusion (Pf) est inférieur à 0° C. Parmi les composés organiques autres qu'un alcool en mélange

avec l'eau, on peut citer l'acétone ($P_f = -95^\circ \text{C}$) ou le chloroforme ($P_f = -64^\circ \text{C}$).

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé se caractérise en ce que ledit solvant est un mélange eau
5 deutérée/méthanol deutéré et contient 50% de méthanol. De même, il est également dans l'étendue de l'invention d'utiliser d'autres types de solvant composé de mélanges eau deutérée/composé organique deutéré et plus particulièrement eau deutérée/alcool deutéré. Les autres types de solvant concernent tous les mélanges
10 eau deutérée/composé organique deutéré. Ces mélanges peuvent varier par la nature du composé organique deutéré employé, par la proportion de composé organique deutéré dans le mélange, ou par le pH du mélange par exemple. Les points de fusion des solvants deutérés diffèrent peu des solvants équivalents protonés. Le solvant
15 le plus sensible à la deutérioration est probablement H_2O , puisque le point de fusion du D_2O est de $3,8^\circ \text{C}$.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé se caractérise en ce que ladite très basse température à laquelle est soumis l'échantillon pendant sa préparation, son stockage et
20 pendant la durée de l'analyse de RMN est inférieure à 0°C . De manière préférée, ladite très basse température pour la préparation et le stockage de l'échantillon est comprise entre -10 et -80°C , et de manière encore préférée, ladite très basse température est inférieure ou égale à -80°C . De manière très préférée, l'échantillon
25 est stocké dans l'azote liquide pour une plus grande stabilité. De manière préférée, ladite très basse température pendant la durée de l'analyse de l'échantillon est comprise entre -20°C et $+5^\circ \text{C}$ de telle sorte que ladite température soit compatible avec l'utilisation du rotor et de la sonde.

Le procédé d'analyse de l'état chimique de ladite cellule selon l'invention utilise la RMN munie d'une sonde liquide, la RMN munie d'une sonde HRMAS haute résolution, de préférence par RMN HRMAS à deux dimensions.

- 5 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites cellules vivantes sont cultivées ou incubées dans un milieu de culture cellulaire ou tissulaire qui contient des molécules enrichies en isotopes stables. De manière plus préférée, lesdites molécules comprennent une
- 10 source de carbone 13 et/ou une source d'azote 15.

- Les cellules vivantes selon l'invention sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, animales ou végétales. Sans en dresser une liste exhaustive, des exemples de cellules vivantes selon l'invention sont donnés ci-après. Parmi les cellules procaryotes, il
- 15 convient de citer les algues bleu-vert, les myxobactéries, les spirochètes, les eubactéries, les rickettsies, les chlamydies, les mycoplasmes, les archéobactéries. Parmi les eubactéries, il convient de citer les entérobactéries telles *Escherichia coli*, les *Bacillus* tels *Bacillus subtilis*, les *Pseudomonas*, les *Campylobacter*,
- 20 les *Rhizobium*, les *Agrobacterium*, les *Azotobacter*, les *Micrococcus*, les *Staphylococcus*, les *Streptococcus*, les *Lactobacillus*. Parmi les cellules de micro-organismes eucaryotes, il convient de citer les algues vertes, brunes ou rouges, les champignons tels les phycomycètes, les ascomycètes, les basidiomycètes, les levures.
- 25 Parmi les levures, il convient de citer *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *candida albicans*. Parmi les cellules animales, il convient de citer de préférence les cellules humaines et les cellules de mammifères tels les bovins, les ovins, les caprins, le porc, les équidés, les rongeurs tels la souris et le rat par exemple.

Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est utilisé pour identifier des cellules vivantes dont l'état physiologique dévie de la norme. Un tel procédé permet d'identifier des cellules vivantes appartenant au groupe composé par exemple de cellules

5 présentant un défaut génétique constitutionnel ou acquis et des cellules soumises à un stress environnemental. Par stress environnemental, on entend désigner un agent physique, chimique ou biologique provoquant une réaction de la cellule. Parmi les agents physiques, il convient de citer entre autres les rayons bêta,

10 les rayons gamma, les rayons X, les ultraviolets, les infra-rouges, la lumière visible. Egalement, des conditions de culture, aérobie ou anaérobie, le pH du milieu de culture, acide, basique ou neutre, la concentration en gaz carbonique ou d'un autre élément dans le milieu de culture, la température constituent des agents physiques

15 selon l'invention. Par agent chimique, on entend désigner tout composé chimique susceptible d'interagir avec la cellule ou un des composants cellulaires membranaires ou intracellulaires ; par exemple, les agents intercalants tels le bromure d'éthidium, l'iodure de propidium constituent des composés chimiques selon

20 l'invention. Les composés biologiques de l'invention correspondent à tous les composés susceptibles de provoquer une réaction biologique cellulaire. On peut citer de manière non exhaustive toutes les molécules interagissant avec un récepteur membranaire tels par exemple les molécules de la communication intercellulaire,

25 les hormones, les cytokines, les lymphokines, les interleukines, les anticorps. Les virus constituent également des agents biologiques selon l'invention. Les agents biologiques selon l'invention incluent également les facteurs génétiques. Ces facteurs génétiques affectent le métabolisme cellulaire ; ces facteurs peuvent être

constitutionnels, comme par exemple dans le cas de maladies génétiques telles par exemple la myopathie de Duchenne, la dystrophie myotonique de Steinert, la mucoviscidose, l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique. Ces facteurs peuvent
5 être acquis comme dans le cas de mutations ou de remaniements chromosomiques, tels une délétion, une insertion, une translocation, une intégration virale. Selon l'invention, lesdites cellules présentant un défaut génétique constitutionnel ou acquis appartiennent de préférence au groupe des cellules cancéreuses, ou
10 des cellules humaines de patient atteint d'un défaut génétique constitutionnel, ou des cellules infectées par un virus.

Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que ledit marqueur spécifique est utilisé pour le criblage de molécules chimiques ou biologiques.

15 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le procédé selon l'invention se caractérise en ce qu'il est utilisé pour identifier un métabolite intracellulaire spécifique d'un type cellulaire et/ou d'un état métabolique cellulaire et/ou de conditions environnementales cellulaires.

20 Le procédé selon l'invention peut également être utilisé pour déterminer la répartition de métabolites intracellulaires ayant incorporés ledit isotope stable, par exemple carbone 13 ou azote 15. Le procédé selon l'invention peut également être utilisé pour déterminer qualitativement les voies métaboliques à l'origine de la
25 formation desdits métabolites et/ou pour déterminer quantitativement les flux intracellulaires générés par la catalyse enzymatique.

La présente invention comprend également la fourniture d'un marqueur spécifique susceptible d'être obtenu par le procédé selon

l'invention. Un exemple de marqueur spécifique est présenté sur la figure 2. L'expérience a consisté à observer le spectre RMN¹³C, avec découplage des protons, 10 minutes avant et 25 minutes après le passage d'une culture de cellules de levure dans des conditions

5 d'aérobic stricte à une culture dans des conditions anaérobies. Des variations très importantes d'intensité, voire des apparitions de pics sont observées, et constituent des marqueurs spécifiques. Ainsi les signaux C1 (55.9 ppm) et C2 (18.0 ppm) de l'éthanol apparaissent en conditions anaérobies, alors que ces signaux ne sont pas

10 significatifs sur le spectre de levures en conditions aérobies. Au contraire, le signal à 91.3 ppm correspondant au C1 du tréhalose disparaît presque entièrement. Un autre exemple de marqueurs spécifiques est observable sur la figure 5.

Enfin, l'invention comprend aussi l'utilisation du pic de

15 spectre de RMN ou de la valeur de mesure de RMN telle qu'identifié par la mise en œuvre du procédé selon l'invention comme marqueur d'un état métabolique donné pour le criblage de cellules vivantes. L'invention concerne donc également un procédé de criblage de cellules vivantes pour l'identification de cellules

20 présentant un état métabolique donné caractérisé en ce qu'on utilise le marqueur selon l'invention. L'invention porte également sur l'utilisation du marqueur selon l'invention pour le criblage de molécules chimiques ou biologiques.

D'autre part, l'invention a également pour objet la fourniture

25 d'un dispositif couplé à la RMN qui garantisse la stabilité de l'état chimique pendant la durée de la mesure de l'état chimique par RMN des échantillons biologiques. L'invention concerne donc un dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend un aimant supraconducteur, une

console électronique, une sonde de mesure RMN et une unité de réfrigération.

Le rôle de l'aimant supraconducteur est de générer un champ magnétique intense (jusqu'à 18,8 T), homogène sur un volume
5 suffisamment important et dont l'intensité est stable dans le temps. La console électronique permet de générer des impulsions haute fréquence (jusqu'à 800 MHz) et de fortes puissances (50W) et de recueillir les signaux émis par l'échantillon. La tête de mesure (brevet européen EP0856741), commercialisée par BRUKER (code
10 article B1867), accueille l'échantillon et lui transmet les impulsions haute fréquence. Elle assure également la détection du signal émis. Le composé soumis à la mesure est contenu dans un rotor en oxyde de zirconium de 4 mm de diamètre. Il est introduit dans la sonde par le haut de l'aimant à l'aide d'une canne de transfert (code
15 article BRUKER K0219) et vient se placer au centre d'une bobine radiofréquence en forme de solénoïde. La partie contenant la bobine et l'échantillon est appelée stator et possède la caractéristique remarquable d'être mobile et, grâce à une commande pneumatique, de pouvoir basculer de sorte que l'axe de la bobine, et par voie de
20 conséquence, de l'échantillon, fasse un angle de 54,7° par rapport au champ magnétique principal généré par l'aimant (figure 1). Une fois dans cette position, la turbine est soulevée et mise en lévitation par un flux pneumatique axial (bearing) d'environ 1500 mbars arrivant par le bas du rotor. Celui-ci est hermétiquement fermé
25 grâce à un capuchon en Kelf qui possède des ailettes permettant la mise en rotation. Celle-ci est réalisée à l'aide d'un second flux pneumatique (drive), de direction tangentielle par rapport à la turbine. La pression du drive est d'environ 500 mbars et le flux d'air qui arrive sur les ailettes du capuchon permet d'atteindre des

vitesses de rotation de l'ordre de 15000 tr/sec. Les pressions de bearing et drive, le basculement du stator ainsi que l'éjection de l'échantillon sont contrôlés par une unité pneumatique BRUKER (code article H2620).

- 5 L'angle de $54^{\circ}7$ que fait l'échantillon avec le champ magnétique principal est appelé couramment angle magique. Il permet en effet de moyenner les importantes différences de susceptibilité magnétique présentes dans des échantillons de cellules vivantes. Cette propriété permet d'obtenir des signaux RMN
- 10 nettement plus fins que ceux obtenus en utilisant des techniques de RMN classique haute résolution liquide qui n'utilisent pas le concept de la rotation à l'angle magique. La technique utilisée est alors connue sous le nom de RMN haute résolution à l'angle magique (RMN HRMAS).
- 15 L'unité de réfrigération, commercialisée par BRUKER sous le nom BCU05 (code article W1210342), est essentielle, puisqu'elle permet de ralentir considérablement, voire de geler, les processus métaboliques de façon à pouvoir étudier par RMN les différents composants chimiques se trouvant à l'intérieur de la cellule sans
- 20 que leurs propriétés ne soient altérées au cours de la mesure RMN. Cette unité refroidit le flux d'air sec servant à la mise en lévitation de l'échantillon (bearing) à des températures pouvant atteindre -20°C , assurant ainsi des températures similaires au niveau de l'échantillon. Cette unité fonctionne au moyen d'air sec et permet
- 25 de générer un débit d'air pouvant atteindre 2500 l/h. Ce flux de gaz doit permettre à l'échantillon d'atteindre les vitesses de rotation élevées requises pour ce type d'expériences. Le débit et la température de l'air doivent être suffisamment stables pour garantir une bonne stabilité de la vitesse de rotation et de la

température afin d'empêcher l'apparition d'artéfacts parasites dans les spectres RMN. Le raccord de l'unité de réfrigération doit pouvoir supporter des pressions importantes tout en étant suffisamment flexible pour pouvoir se connecter facilement à la sonde et absorber

5 d'éventuelles vibrations qui pourraient nuire à la mesure RMN.

Ce dispositif se caractérise en ce qu'il permet de réaliser la mesure RMN à une température régulée inférieure à 0°C, de préférence entre 0 et -20°C.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente

10 invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants. Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

FIGURES

15

Figure 1 : Schéma général du dispositif.

1. Angle magique : 54,735°
2. Canne d'injection et d'éjection
3. Gaz de rotation (drive)
- 20 4. Gaz porteur (bearing)
5. Blindage
6. Céramiques de support
7. Bobine RF
8. Stator en position verticale pour éjecter l'échantillon
- 25 9. Vers les circuits d'accord
10. Contact mobile
11. Câble de mesure de la vitesse de rotation
12. Air pour éjection de l'échantillon
13. Tube support

14. Pivots hermétiques
15. Tubes servant à l'éjection de l'échantillon
16. Arrivée d'air pour la mise en position verticale
17. Arrivée d'air pour la mise en position à l'angle magique
- 5 18. Piston pneumatique
19. Vis micrométrique pour réglage de l'angle magique
20. Dewar
21. Thermocouple
22. Arrivée de gaz porteur
- 10 23. Résistance chauffante

Figure 2 : Spectre RMN ^{13}C avec découplage des protons :

- en conditions d'aérobie stricte (en bas).

Conditions expérimentales : temps d'acquisition 1s, temps d'attente
15 5s, 350 acquisitions, durée d'enregistrement 30mn, vitesse de rotation de l'échantillon 1 kHz.

- 25 minutes après le passage de conditions d'aérobie stricte à des conditions d'anaérobie (en haut).

Conditions expérimentales : temps d'acquisition 1s, temps d'attente
20 5s, 639 acquisitions, durée d'enregistrement 53mn, vitesse de rotation de l'échantillon 1 kHz. Les signaux caractéristiques de l'éthanol sont indiqués par un astérisque.

Figure 3 : Influence de la température sur la résolution des spectres protons effectués par RMN HR MAS sur des levures. Le
25 spectre proton obtenu à -10°C (spectre du haut) montre une résolution légèrement inférieure à celle observée sur le spectre obtenu à une température ambiante ($+25^{\circ}\text{C}$) (spectre du bas).

Conditions expérimentales : 7 mg de cellules lyophilisées, solvant 50 µl méthanol-d₄:D₂O dans le rapport volumique 1:1, temps d'acquisition 1,4s, temps de pré-saturation 0,9 s, 256 acquisitions, durée d'enregistrement 10mn, vitesse de rotation de l'échantillon 4
5 kHz. Le D₂O contient 0,75% de TSP (acide tri-silyle-d₄-propionate comme référence en déplacement chimique).

Figure 4 : Influence de la température sur la stabilité des spectres protons effectués par RMN HR MAS sur des levures.

10 Les conditions de préparation des échantillons et d'enregistrement des spectres sont identiques à celles de la figure 3. L'expérience a été réalisée à +25°C (spectres A1 et A2) et à -10°C (spectres B1 et B2). Les spectres ont été enregistrés immédiatement après préparation de l'échantillon et réglages du spectromètre (spectres
15 A1 et B1), puis après 1h50mn dans les conditions d'acquisition de données RMN en maintenant constante la température (A2 et B2). On observe une beaucoup plus grande stabilité de l'échantillon nettement supérieure à -10°C qu'à +25°C. Par exemple, à +25°C, dans la zone du spectre décrite par la figure, les signaux à 8.93,
20 8.92 et 8.56 ppm disparaissent presque entièrement tandis que les signaux à 8.61, 8.10 et 8.08 ppm augmentent nettement d'intensité. Au contraire, à -10°C, les variations d'intensité restent très faibles sur tout le spectre.

25 **Figure 5 : Caractérisation de levures par RMN ¹H.** Les conditions de préparation des échantillons sont identiques à celles de la figure 3. Spectres proton de deux cultures d'ultralevure (UL et UL') et d'une culture de levure de panification (PS) stoppées au moment de la consommation totale du glucose (10 g de glucose par litre de

- culture). Cet instant est défini par un dosage enzymatique du glucose. Les spectres de UL et UL' montrent une très bonne reproductibilité de toutes les étapes expérimentales menant à l'enregistrement des spectres. Les différences spectrales entre UL et
- 5 PS permettent aisément de distinguer les deux levures. Conditions expérimentales RMN identiques à celles de la figure 3, sauf $T=+2^{\circ}\text{C}$ et solvant 50 μl D₂O.

EXEMPLES

1. MATERIEL ET METHODES

Les cellules sont prélevées directement à partir de la culture
5 cellulaire et plongées directement dans l'azote liquide ou dans un
mélange eau/méthanol (50 % en volume) à -40°C. Cette étape a
pour objectif de stopper par le froid les réactions intracellulaires. Le
gradient de température imposé aux cellules optimise la vitesse du
transfert de chaleur et a pour conséquence un arrêt instantané du
10 métabolisme intracellulaire.

Les cellules sont ensuite centrifugées. Le culot cellulaire est
rincé deux fois au PBS (Phosphate Buffer Saline, tampon salin
phosphate), puis centrifugé une dernière fois. Les cellules sont
ensuite lyophilisées et stockées à -80°C.

15 L'échantillon à mesurer est préparé en mélangeant,
directement à 0°C, dans le rotor porte-échantillon, 7 mg de cellules
lyophilisées à une solution de 50 µl de mélange méthanol deutéré et
eau deutérée dans un rapport volumique de 1 : 1 et contenant
0,375% de TSP comme référence de déplacement chimique. Après
20 10 secondes d'agitation au vortex pour homogénéiser l'échantillon,
le rotor est transporté dans un bain de glace pilée et est prêt pour
analyse par RMN. Le spectre est enregistré après mise en rotation
du rotor, stabilisation de la température de l'échantillon,
synthonsation de la tête de mesure et optimisation de
25 l'homogénéité du champ magnétique B₀. L'ensemble de ces
opérations de réglage ne doit pas dépasser 5 mn.

2. RESULTATS

La figure 3 montre que la résolution des spectres est légèrement inférieure à basse température. Celle-ci reste toutefois très acceptable pour l'analyse et l'interprétation de spectres RMN HRMAS obtenus ainsi.

5 La figure 4 montre une stabilité bien supérieure de l'échantillon à basse température. Ce résultat montre que les spectres enregistrés à -10°C donnent une image beaucoup plus exacte de l'état cellulaire à examiner que les spectres obtenus à température ambiante. La méthode, qui bloque l'état cellulaire
10 grâce à l'abaissement de la température, permet donc d'améliorer notablement la sensibilité de la mesure en rendant possible l'augmentation de la durée d'acquisition des spectres RMN. Le fait de geler l'état des systèmes biologiques à étudier donne alors la possibilité d'enregistrer des expériences de RMN à deux dimensions
15 (RMN 2D). Celles-ci, de types homo-nucléaires (ex : COSY, TOCSY, NOESY) ou hétéro-nucléaires (ex : corrélation inverse ^1H - ^{13}C ou ^1H - ^{15}N de type HSQC, HMQC et/ou HMBC) permettent d'apporter des informations structurales et dynamiques sur les métabolites étudiés. D'autre part, la RMN 2D permet d'augmenter très
20 nettement la résolution grâce, notamment, à la dispersion spectrale sur la deuxième dimension.

Les figures 2 et 5 montrent la possibilité de caractériser en quelques minutes une culture cellulaire. Par comparaison à une banque de données, des échantillons cellulaires peuvent être
25 caractérisés par leur type (figure 5) ou leurs conditions de culture (figure 2). Ces exemples peuvent facilement être étendus à d'autres variations de culture de cellules (milieu de culture, pH, température, instant du prélèvement) et à des différences génétiques se répercutant sur le réseau métabolique (mutations).

REFERENCES

- Cameron *et al.* (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8 : 175-80.
- 5 De Koning *et al.* (1992) Anal Biochem. 204 : 118-123.
- Gadian *et al.* (1983) Oxford University Press (Eds), Oxford, UK.
- Gancedo *et al.* (1973) Biochimie 55 : 205-211.
- 10 Gonzalez *et al.* (1997) Yeast 13 : 1347 - 1356.
- Jeffrey *et al.* (1991) Trends Biochem. Sci. 16 : 5-10.
- 15 Middleton *et al.* (1998) Magn Reson Med. 40 : 166-169.
- Ryll *et al.* (1991) J Chromatogr. 570 : 77-88.
- Seiler *et al.* (1994) Institute of Biotechnology, ETH, Zurich.
- 20 Teusink *et al.* (1998) J. Bacteriol. 180 : 556-562.
- Theobald *et al.* (1996) Biotechnology Techniques. 10 : 297-302.
- 25 Weuster-Botz *et al.* (1996) Adv. Biochem. Eng. Biotech. 34 : 75-108.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'analyse de l'état chimique de cellules vivantes en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) par
- 5 comparaison d'au moins un spectre de RMN et/ou d'au moins une valeur de mesure de RMN obtenue sur un échantillon desdites cellules vivantes avec au moins un spectre de RMN et/ou d'au moins une valeur de mesure de RMN de référence obtenue sur au moins un échantillon de cellules vivantes de référence, de façon à
- 10 identifier au moins un pic dudit spectre de RMN et/ou au moins une valeur de mesure de RMN constituant un marqueur spécifique de l'état métabolique desdites cellules vivantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de préparation dudit échantillon dans des conditions permettant de figer l'état chimique desdites cellules
- 15 vivantes, ledit échantillon étant soumis à une très basse température pendant un temps suffisant pour arrêter les réactions intracellulaires entre le moment du prélèvement dudit échantillon et le moment de mesure de l'état chimique des cellules, et également pendant toute la durée de l'analyse, ladite préparation
- 20 dudit échantillon comprenant les étapes suivantes :
- a) L'immersion directe et immédiate dudit échantillon dans l'azote liquide;
 - b) La lyophilisation dudit échantillon ;
 - c) Eventuellement le stockage dudit échantillon à très
 - 25 basse température ;
 - d) Au moment souhaité pour l'analyse, le mélange et la remise en solution à très basse température dudit échantillon lyophilisé avec un solvant ayant un point de fusion très bas.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que à la place de l'azote liquide, on utilise un mélange eau/méthanol tamponné à très basse température.

5

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit mélange eau/méthanol est tamponné à pH 7,5 et contient 50% de méthanol.

10

4. Procédé selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit solvant est un mélange eau deutérée/méthanol deutéré tamponné à pH 7,5 et contient 50% de méthanol.

5. Procédé selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite très basse température est inférieure à 0°C.

15

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite très basse température est comprise entre -10 et -80°C.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite très basse température est inférieure ou égale à -80°C.

20

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la température pendant la durée de l'analyse de RMN est inférieure à 0°C.

25

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite température est comprise entre -5°C et -20°C.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'analyse de l'état chimique de ladite cellule est effectuée par RMN HRMAS, de préférence par RMN HRMAS à deux dimensions.

5

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit échantillon est prélevé dans un milieu de culture cellulaire ou tissulaire qui contient des molécules enrichies en isotopes stables dans lequel lesdites cellules
10 vivantes sont cultivées ou incubées.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que lesdites molécules comprennent une source de carbone 13 et/ou une source d'azote 15.

15

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdites cellules vivantes sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, animales ou végétales.

20

14. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes pour identifier des cellules vivantes dont l'état physiologique dévie de la norme.

15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que
25 lesdites cellules vivantes appartiennent au groupe composé de cellules présentant un défaut génétique constitutionnel ou acquis et des cellules soumises à un stress environnemental.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que lesdites cellules présentant un défaut génétique sont des cellules cancéreuses ou des cellules infectées par un virus.

5 17. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 pour identifier un métabolite intracellulaire spécifique d'un type cellulaire et/ou d'un état métabolique cellulaire et/ou de conditions environnementales cellulaires.

10 18. Utilisation d'un procédé selon les revendications 1 à 13 pour :

a) déterminer la répartition de métabolites intracellulaires ayant incorporé ledit isotope stable ; et/ou

15 b) déterminer qualitativement les voies métaboliques à l'origine de la formation desdits métabolites ; et/ou

c) déterminer quantitativement les flux intracellulaires générés par la catalyse enzymatique.

20 19. Marqueur spécifique susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

20. Procédé de criblage de cellules vivantes pour l'identification de cellules présentant un état métabolique donné caractérisé en ce qu'on utilise le marqueur selon la revendication 19.

25

21. Utilisation du marqueur selon la revendication 19 pour le criblage de molécules chimiques ou biologiques.

22. Dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 et 20, caractérisé en ce qu'il comprend un aimant supraconducteur, une console électronique, une sonde de mesure RMN et une unité de réfrigération.

1/5

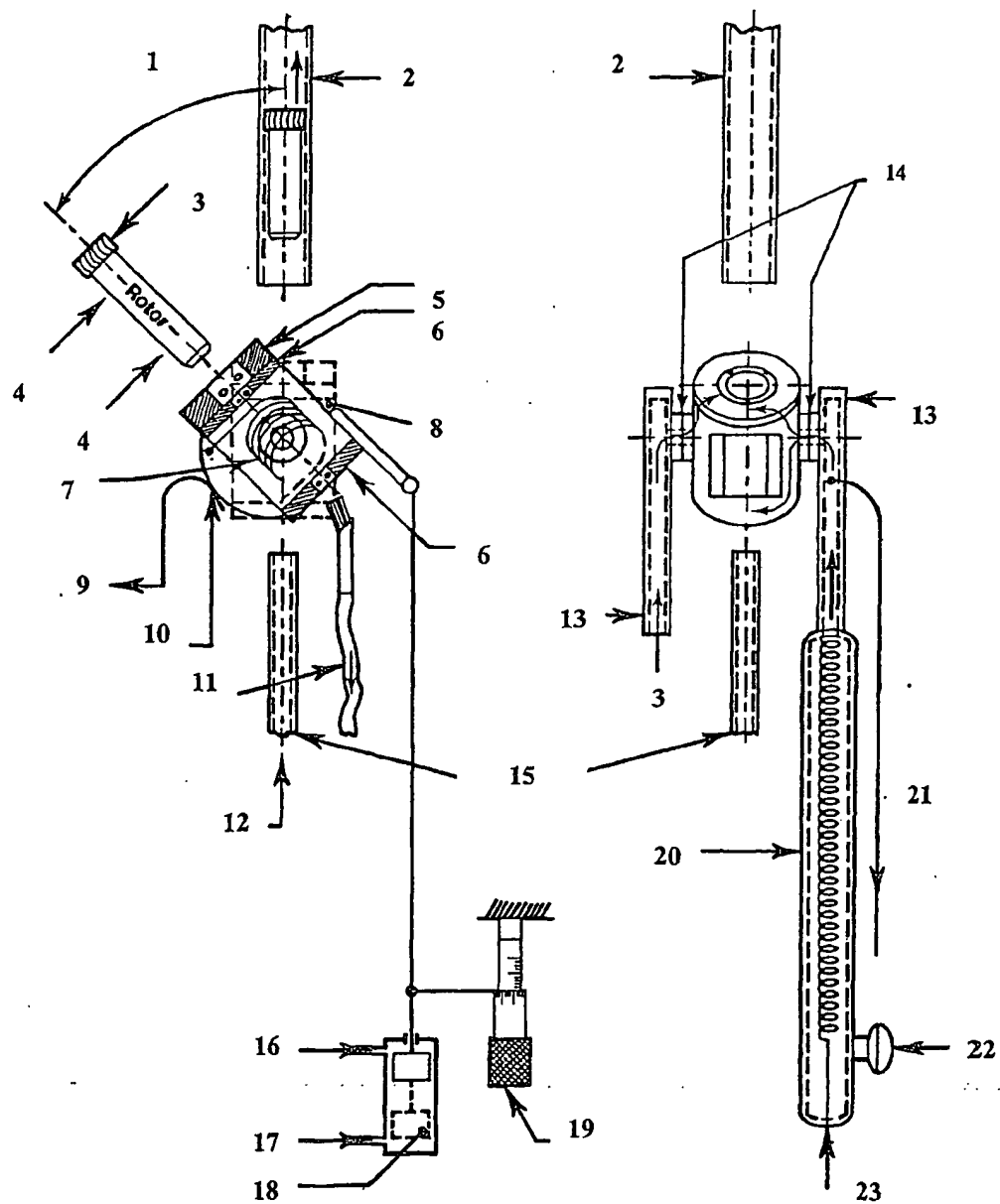


Figure 1

2 / 5

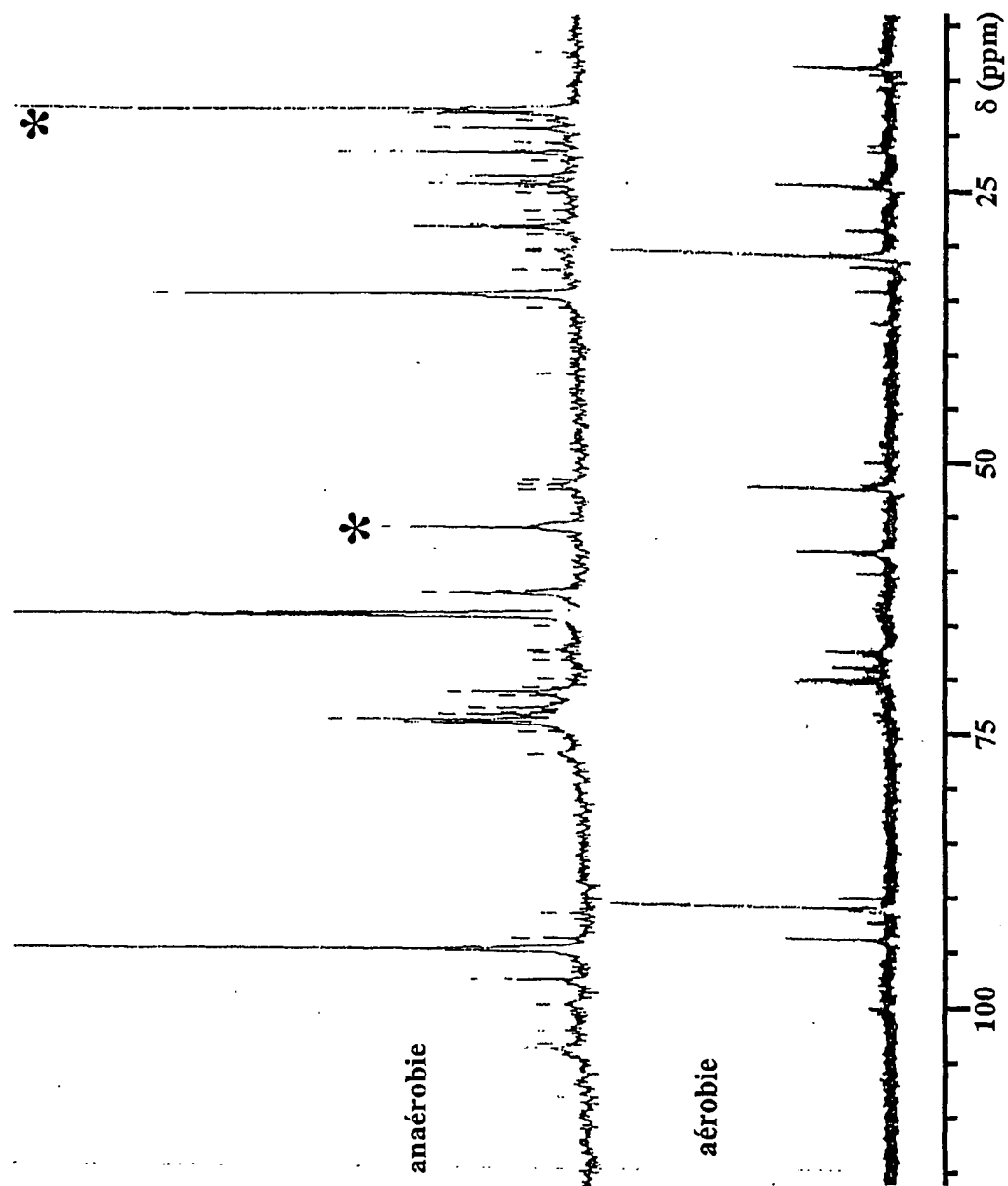
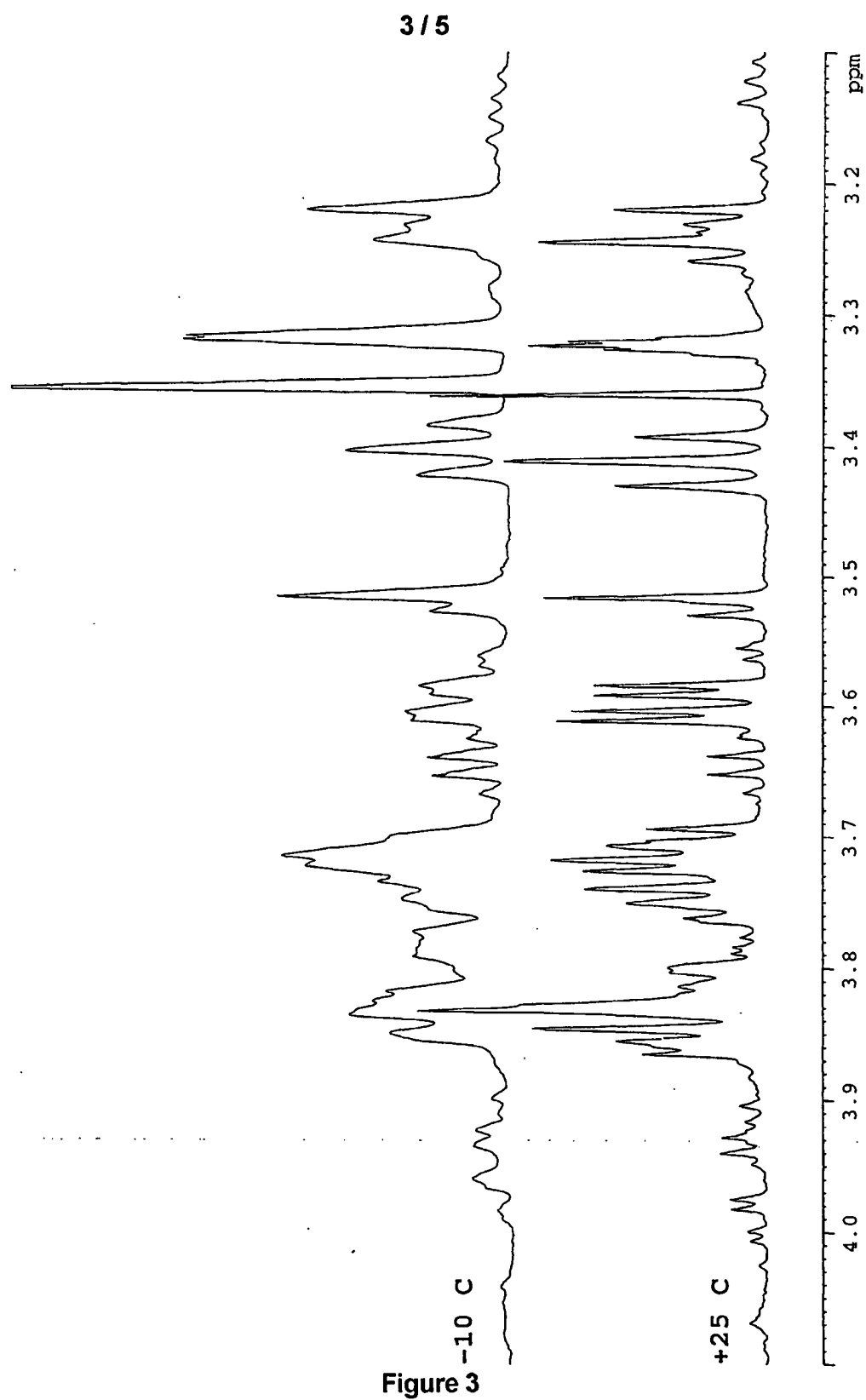


Figure 2



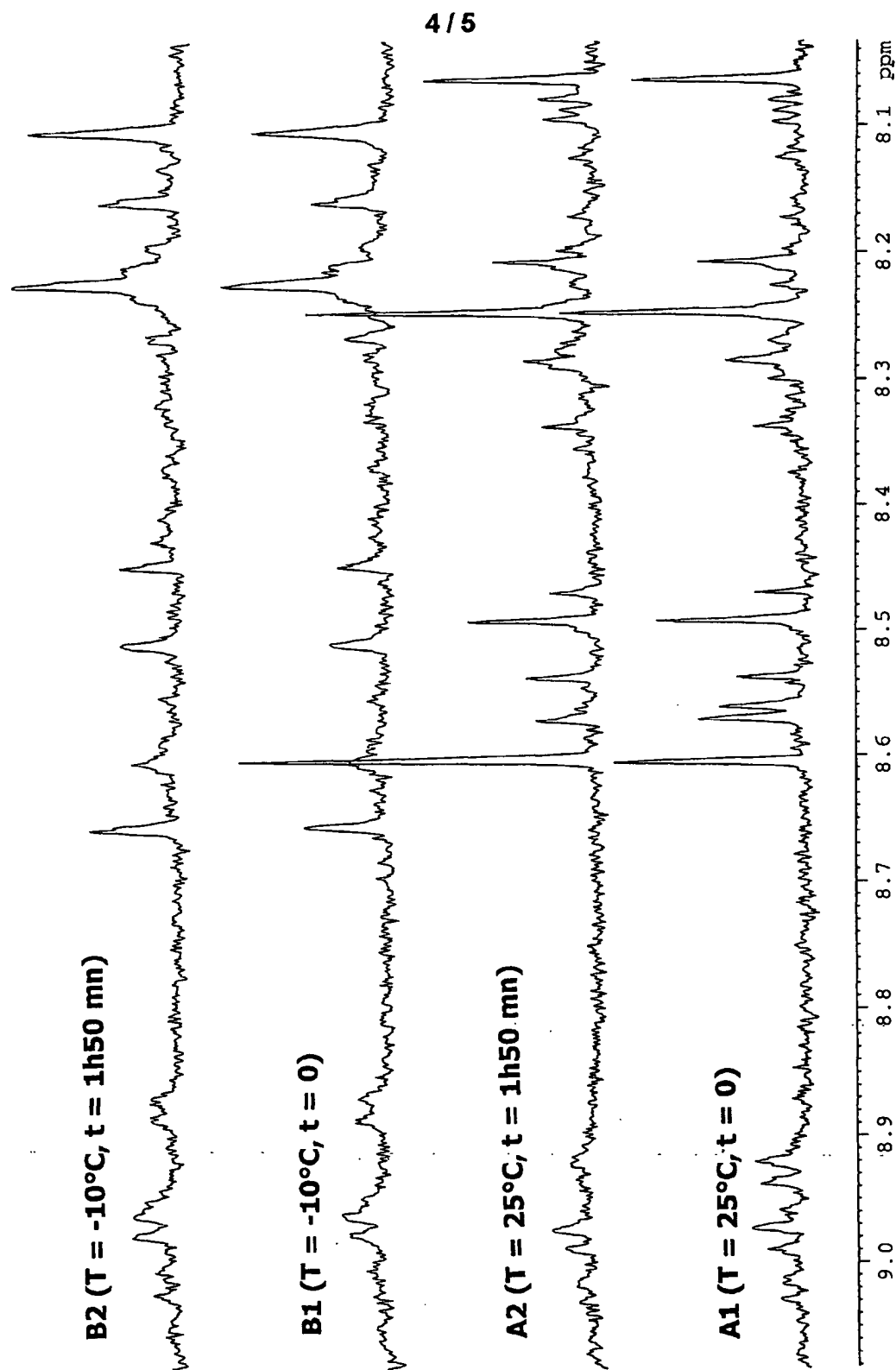


Figure 4

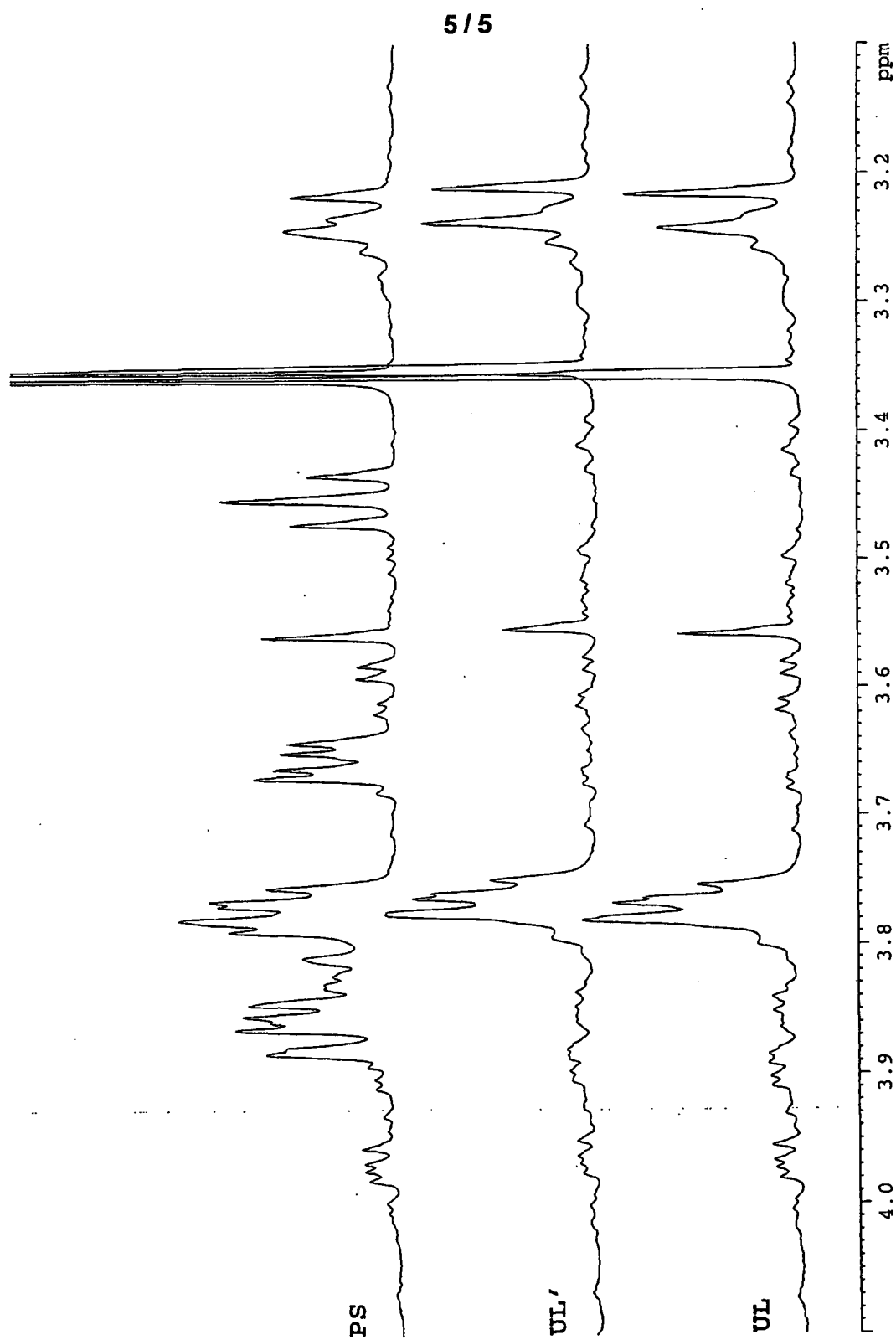


Figure 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/03167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01R33/465 C12Q1/02 G01N1/42 G01R33/30 G01N33/483

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01R G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

INSPEC, EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|------------------------------------|
| X | <p>FOWLER A H ET AL: "DIFFERENTIATION OF HUMAN PROSTATE CANCER FROM BENIGN HYPERTROPHY BY IN VITRO 1H NMR" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE,US,ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, vol. 25, no. 1, 1 May 1992 (1992-05-01), pages 140-147, XP000275042 ISSN: 0740-3194</p> <p>* the whole document *</p> <p>---</p> <p>-/--</p> | <p>1,5-7, 10, 13-16,22</p> |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2001

Date of mailing of the international search report

04/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Skalla, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/03167

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y | <p>QUISTORFF BJORN ET AL: "Methods for liquid- and solid-state CP-MAS NMR spectroscopy of untreated tissue biopsies." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 213, no. 1, 1993, pages 68-74, XP001007253 ISSN: 0003-2697 * the whole document *</p> | 1-10, 13-16 |
| Y | <p>DE KONING W ET AL: "A METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHANGES OF GLYCOLYTIC METABOLITES IN YEAST ON A SUBSECOND TIME SCALE USING EXTRACTION AT NEUTRAL PH" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 204, no. 1, 1992, pages 118-123, XP001007232 ISSN: 0003-2697 cited in the application * the whole document *</p> | 1-10, 13-16 |
| A | <p>WIND R A ET AL: "An investigation of rat mammary healthy and R3230AC tumor tissues and cells by means of solid-state /sup 13/C NMR" SOLID STATE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE, DEC. 1996, ELSEVIER, NETHERLANDS, vol. 7, no. 3, pages 263-269, XP001007010 ISSN: 0926-2040 * the whole document *</p> | 1-22 |
| A | <p>CHENG L L ET AL: "Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, NOV. 1996, WILLIAMS & WILKINS, USA, vol. 36, no. 5, pages 653-658, XP002170690 ISSN: 0740-3194 * the whole document *</p> | 1,5,6, 10,13-17 |
| A | <p>TATE A R ET AL: "Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of /sup 1/H magic angle spinning (MAS) NMR spectra" NMR IN BIOMEDICINE, APRIL 2000, WILEY, UK, vol. 13, no. 2, pages 64-71, XP002170691 ISSN: 0952-3480 * the whole document *</p> | 1,10, 13-16 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 01/03167

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 92 01946 A (BRUKER ANALYTISCHE MESSTECHNIK) 6 February 1992 (1992-02-06) cited in the application page 7 -page 16 page 20 | 1,5,6, 13-17 |
| A | ----- MIDDLETON D A ET AL: "The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, JULY 1998, WILLIAMS & WILKINS, USA, vol. 40, no. 1, pages 166-169, XP002170692 ISSN: 0740-3194 cited in the application * the whole document * | 1-22 |
| A | ----- WATERS N J ET AL: "High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: Optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 282, no. 1, 15 June 2000 (2000-06-15), pages 16-23, XP002170693 ISSN: 0003-2697 * the whole document * | 1 |
| A | ----- HIDETO HANAOKA: "IN VITRO CHARACTERIZATION OF LUNG CANCERS BY THE USE OF 1H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY OF TISSUE EXTRACTS AND DISCRIMINANT FACTOR ANALYSIS" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE,US,ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, vol. 29, no. 4, 1 Apr 11 1993 (1993-04-01), pages 436-440, XP000368010 ISSN: 0740-3194 * the whole document * | 1 |
| A | ----- ALLEN P J ET AL: "APPARATUS FOR LOW-TEMPERATURE MAGIC-ANGLE SPINNING NMR" JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE,US,ACADEMIC PRESS, ORLANDO, FL, vol. 92, no. 3, 1 May 1991. (1991-05-01), pages 614-617, XP000203289 ISSN: 1090-7807 * the whole document * | 22 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03167

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9201946 | A | 06-02-1992 | WO 9201946 A1 | 06-02-1992 |
| | | | AU 651318 B2 | 21-07-1994 |
| | | | DE 59009072 D1 | 14-06-1995 |
| | | | EP 0493386 A1 | 08-07-1992 |
| | | | US 5318031 A | 07-06-1994 |
| <hr/> | | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No
PCT/FR 01/03167

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01R33/465 C12Q1/02 G01N1/42 G01R33/30 G01N33/483 | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE | | |
| Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01R G01N C12Q | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) INSPEC, EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | FOWLER A H ET AL: "DIFFERENTIATION OF HUMAN PROSTATE CANCER FROM BENIGN HYPERTROPHY BY IN VITRO 1H NMR" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE,US,ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, vol. 25, no. 1, 1 mai 1992 (1992-05-01), pages 140-147, XP000275042 ISSN: 0740-3194 * le document en entier * <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div> | 1,5-7, 10, 13-16,22 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> | | |
| <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">20 décembre 2001</div> | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">04/01/2002</div> |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Skalla, J</div> |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : Internationale No
PCT/FR 01/03167

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| Y | <p>QUISTORFF BJORN ET AL: "Methods for liquid- and solid-state CP-MAS NMR spectroscopy of untreated tissue biopsies." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 213, no. 1, 1993, pages 68-74, XP001007253 ISSN: 0003-2697 * le document en entier *</p> | 1-10, 13-16 |
| Y | <p>DE KONING W ET AL: "A METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHANGES OF GLYCOLYTIC METABOLITES IN YEAST ON A SUBSECOND TIME SCALE USING EXTRACTION AT NEUTRAL PH" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 204, no. 1, 1992, pages 118-123, XP001007232 ISSN: 0003-2697 cité dans la demande * le document en entier *</p> | 1-10, 13-16 |
| A | <p>WIND R A ET AL: "An investigation of rat mammary healthy and R3230AC tumor tissues and cells by means of solid-state /sup 13/C NMR" SOLID STATE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE, DEC. 1996, ELSEVIER, NETHERLANDS, vol. 7, no. 3, pages 263-269, XP001007010 ISSN: 0926-2040 * le document en entier *</p> | 1-22 |
| A | <p>CHENG L L ET AL: "Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, NOV. 1996, WILLIAMS & WILKINS, USA, vol. 36, no. 5, pages 653-658, XP002170690 ISSN: 0740-3194 * le document en entier *</p> | 1,5,6, 10,13-17 |
| A | <p>TATE A R ET AL: "Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of /sup 1/H magic angle spinning (MAS) NMR spectra" NMR IN BIOMEDICINE, APRIL 2000, WILEY, UK, vol. 13, no. 2, pages 64-71, XP002170691 ISSN: 0952-3480 * le document en entier *</p> | 1,10, 13-16 |

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e Internationale No

PCT/FR 01/03167

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | <p>WO 92 01946 A (BRUKER ANALYTISCHE MESSTECHNIK) 6 février 1992 (1992-02-06) cité dans la demande page 7 -page 16 page 20</p> | 1,5,6, 13-17 |
| A | <p>-----</p> <p>MIDDLETON D A ET AL: "The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, JULY 1998, WILLIAMS & WILKINS, USA, vol. 40, no. 1, pages 166-169, XP002170692 ISSN: 0740-3194 cité dans la demande * le document en entier *</p> | 1-22 |
| A | <p>-----</p> <p>WATERS N J ET AL: "High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: Optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 282, no. 1, 15 juin 2000 (2000-06-15), pages 16-23, XP002170693 ISSN: 0003-2697 * le document en entier *</p> | 1 |
| A | <p>-----</p> <p>HIDETO HANAOKA: "IN VITRO CHARACTERIZATION OF LUNG CANCERS BY THE USE OF 1H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY OF TISSUE EXTRACTS AND DISCRIMINANT FACTOR ANALYSIS" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE,US,ACADEMIC PRESS, DULUTH, MN, vol. 29, no. 4, 1 avril 1993 (1993-04-01), pages 436-440, XP000368010 ISSN: 0740-3194 * le document en entier *</p> | 1 |
| A | <p>-----</p> <p>ALLEN P J ET AL: "APPARATUS FOR LOW-TEMPERATURE MAGIC-ANGLE SPINNING NMR" JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE,US,ACADEMIC PRESS, ORLANDO, FL, vol. 92, no. 3, 1 mai 1991 (1991-05-01), pages 614-617, XP000203289 ISSN: 1090-7807 * le document en entier *</p> | 22 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

membres de familles de brevets

Der Internationale No

PCT/FR 01/03167

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 9201946 A | 06-02-1992 | WO 9201946 A1 | 06-02-1992 |
| | | AU 651318 B2 | 21-07-1994 |
| | | DE 59009072 D1 | 14-06-1995 |
| | | EP 0493386 A1 | 08-07-1992 |
| | | US 5318031 A | 07-06-1994 |
| ----- | | | |